no ab

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

237

O. VERONA

# Sopra i microrganismi presenti nelle olive colpite da *Dacus oleae* e sulla loro attività lipolitica

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME XI - (IL DALLA FONDAZIONE)
— 1950 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

237

O. VERONA

# Sopra i microrganismi presenti nelle olive colpite da *Dacus oleae* e sulla loro attività lipolitica

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME XI - (IL DALLA FONDAZIONE)
— 1950 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/universita-di-pisa-osservatorio-regionale-di-fitopatologia_1950_237

3

O. VERONA

# SOPRA I MICRORGANISMI PRESENTI NELLE OLIVE COLPITE DA "DACUS OLEAE„ E SULLA LORO ATTIVITÀ LIPOLITICA

RIASSUNTO - Nelle olive colpite da *Dacus oleae* si sviluppano germi (batteri, lieviti, funghi) che, almeno in parte, si dimostrano lipolitici. Diverse specie sono state isolate e diagnosticate.

Ciò spiega come l'olio ottenuto dalla spremitura di queste olive presenti una forte acidità libera.

D'altronde, lo stesso sviluppo microbico, indipendentemente da ogni attività lipolitica, si pensa che possa essere causa di alterazione del prodotto per il possibile passaggio, nell'olio, di composti dovuti al metabolismo microbico.

RÉSUMÉ - Lorsque les olives sont attaquées par *Dacus olea* on y peut observer le développement de certains germes (bactéries, ferments, cryptogames), dont une partie au moins est lipolytique. On a pu isoler et déterminer plusieurs espèces différentes de ces micro-organismes.

Leur présence explique la raison pour laquelle dans l' huile obtenue de ces olives on trouve une grande quantité d'acides libres.

D'ailleurs, indépendemment de toute activité lipolytique, ce développement microbien pourrait expliquer l'altération de l' huile causée par la transmigration éventuelle dans cette derniere des produits du métabolisme microbien.

SUMMARY - The olives afflicted with *Dacus olea* develop germs (bacteria, ferments and fungi) which can be proved to be at any rate partly lipolytic. Various species have been isolated and determined.

This explains while the oil obtained from the pressing of these olives centains free acidity.

On the other hand, it is believed that the same microbic development, quite independently of any lipolytic effects, be the cause of a deterioration of the product due to the possible introduction into the oil of substances resulting from microbic metabolism.

ZUSAMMENFASSUNG - In den von *Dacus olea* befallenen Oliven entwickeln sich Keime (Bakterien, Hefen, Pilzen) die sich, wenigstens teilweise als fettlosend erweisen. Verschiedene Species wurden isoliert und diagnostisch grepüft.

Dies erklart, warum das aus der Pressung dieser Oliven gewonnene Oel eine starke ungebundene Säuerlichkeit aufweist.

Im übrigen nimmt man an, dass, abgesehen von jeglicher fettlösenden Wirkung, dieser gleiche mikrobische Entwicklungsprozess der Grund dafür sein kann, dass sich das Produkt ändert, denn es ist möglich, dass Verbindungen, die des mikrobischen Metabolismus wegen entstanden, in das Oel übergegangen sind.

## I. - *Le caratteristiche dell'olio vermato.*

Sono noti i danni prodotti dal *Dacus oleae*. Essi incidono profondamente sulla produzione quantitativa come, e non meno, sulle qualità organolettiche dell'olio.

E. LUCCHETTI (1) trovava ad es. che la diminuzione del contenuto in grasso in olive vermate scendeva al 18,6 % rispetto al 24,3 delle olive sane e che le costanti fisiche e chimiche dell'olio vermato potevano riassumersi nei seguenti dati:

| | |
|---|---|
| p. sp. a 15° C. . . . . | 0,9171 |
| indice di rifrazione a 20° C. . . . | 1,46988 |
| acidità % . . . . . | 9,60 |
| N. di iodo: dell'olio . . . . . | 85,9 |
| degli acidi liquidi . . . | 101,— |
| % di acidi grassi: liquidi . . . . | 85,— |
| solidi . . . . | 15,— |
| insaponificabili . . . . . | 1,38 |
| N. di saponificazione . . . . . | 191,5 |

Si rileva che la densità, essendo nell'olio normale di 0,9160, è leggermente superiore; notevole l'acidità; maggiore il contenuto in acidi grassi solidi; elevato l'insaponificabile e superiore al normale il punto di fusione degli acidi grassi solidi per presenza di non trascurabile quantità di acido stearico.

Oltre che sulle costanti fisico-chimiche i danni dell'infestazione dacica si riflettono anche sulla stabilità dell'olio e questo in misura assai più sensibile che in olî provenienti da olive colpite da altri insetti. In olî ottenuti da olive

(1) - E. LUCCHETTI - *L'olio da olive bacate* - Ann. Fac. Agr. Univ. di Pisa, N.S., 4, *203*, 1941.

colpite dal *Dacus*, da *Phloeothrips oleae* e da *Prays oleaellus* rilevava infatti, lo stesso LUCCHETTI, le seguenti variazioni di acidità nel tempo:

| Olio da olive alterate da: | Acidità dopo mesi | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| *Phloeothrips oleae* | 1,60 | 1,60 | 1,70 | 1,70 | 1,80 |
| *Dacus oleae* | 9,60 | 9,90 | 10,30 | 10,90 | 11,02 |
| *Prays oleaellus* | 5,15 | 5,25 | 5,30 | 5,60 | 5,90 |

A parte dunque la maggiore acidità in partenza si nota, nei riguardi dell'olio vermato, un aumento di acidità assai sensibile nel tempo.

Pari rilievi, d'altronde, erano già stati fatti da PANTANELLI e BRANDONISIO nel 1933 (1) nei riguardi dell'olio di Bitonto.

Traggo dalla loro esauriente monografia, i dati che seguono:

| | Costanti fisiche e caratteri chimici dell'olio di Bitonto ottenuto da: | |
|---|---|---|
| *Costanti fisiche* | *Olive sane* | *Olive vermate* |
| Peso specifico a 15° | 0,9167 | 0,9165 |
| Grado refrattometrico a 25° | 62,1 | 62,2 |
| Viscosità in gradi Engler a 25° | 11,25 | 10,88 |
| Temperatura di intorbidamento | 8° | 8° |
| *Caratteri chimici* | | |
| Acidità in acido oleico | 0,49 | 0,92 |
| N. di saponificazione | 191.48 | 193,7 |
| N. di iodio dell'olio | 82,53 | 80,82 |
| » » » degli acidi liquidi | 96,98 | 100,14 |
| Gliceridi liquidi % | 85,32 | 82,01 |
| » solidi % | 13,75 | 17,22 |
| Materia insaponificabile % | 0,916 | 0,852 |

(1) - E. PANTANELLI e V. BRANDONISIO - *L'olio di Bitonto*. Bari, 1933.

— Composizione centesimale dei gliceridi

| | | |
|---|---|---|
| Oleina | 77,74 | 69,6 |
| Linoleina | 7,52 | 11,6 |
| Palmitina | 13,54 | 17.3 |
| Stearina | 0,05 | tracce |
| Miristina | 0,18 | 0,6 |

Notano, gli Autori, che l'olio vermato contiene in particolare più palmitina e più linoleina il che spiega il più facile e forte irrancidimento.

* * *

La maggiore acidità presentata dagli olî vermati deve essere certo messa in rapporto ad una più intensa attività lipolitica in seno alle olive, attività, che, poi, si trasferisce nell'olio.

Nel fatto non si può escludere, intanto, un diretto intervento degli stessi insetti. Pur non sapendo se sono state fatte ricerche al riguardo ciò è dato di pensare alle luce di alcuni recenti lavori di FODOR (1) che ha segnalato, con esauriente dimostrazione, presenza di enzimi lipolitici in diversi insetti. Tutto lascia pensare che analoghe e fors'anche più intense attività siano possedute dalle larve del *Dacus* destinate a compiere buona parte del loro ciclo vitale in frutti oleosi.

Ad ogni modo, indipendentemente o, nel supposto di cui sopra, concomitatamente alla attività lipolitica del *Dacus*, sulla maggiore acidità degli olî vermati e sulla loro minore stabilità deve sicuramente influire la microflora che si sviluppa, copiosa, sui frutti attaccati dall' insetto, sia che essi rimangono sulla pianta sia, ancor più, che essi cadano a terra. È, questo, un fenomeno secondario che accompagna sempre l'infestazione dacica; ma è un fenomeno

(1) - P. J. FODOR - *The specific inhibition by sodium taurocholato of taet of the lipolytic enzyme systems contained in extracts from various organs og the grasshopper* - Enzymologia, **12**, *133*, 1948.
— — - *Studies on the nature of insect lipases and esterases II: The esterases and lipases of the grasshopper* - Id. **12**, *343*, 1948.
— — - *The specificity of the action of insect lipase* - Id. **13**, *57*, 1948.
— — - *The specificity of the lipases and esterases contained in the larvae of the Silk Worm (Bombix mori L.)* - Id. **13**, *67*, 1948.

tutt'altro che trascurabile ancorchè non sia stato messo in giusto rilievo almeno sperimentalmente e sotto questo punto di vista.

II. - *Segnalazione di specie microbiche presenti nelle olive vermate.*

Ben poco sappiamo quali sono le specie microbiche attualmente presenti nelle olive vermate all'infuori di due o tre specie di funghi noti più che altro come parassiti secondari. È ricordato, al riguardo, *Sphaeropsis dalmatica* (THÜM.) GIGANTE (1) e *Gloeosporium olivarum* ALM. (2) conseguendo la loro infezione, il più delle volte, gli attacchi della mosca. L'uno e l'altro fungo elaborano enzimi lipolitici, sia pure più o meno attivi in rapporto all'insorgenza di mutazioni e quindi alla provenienza dei ceppi.

Un esame superficiale della questione porterebbe a concludere che la flora microbica che accompagna l'infestazione dacica non potrebbe essere che quella abitualmente presente nell'ambiente. E di fatto, l'origine dell'infezione, è ovviamente ambientale. Ma è pur vero che nel frutto possono ben determinarsi azioni selettive, data la particolare composizione del substrato, come azioni di adattamento, sì da far rinvenire, in definitiva, più frequenti certe specie, meno frequenti certe altre. Non è detto peraltro, che tutte le specie presenti debbano essere necessariamente lipolitiche in quanto qualcuna, pur non utilizzando i grassi, può trovare negli altri composti contenuti nelle olive sufficienti condizioni di alimentazione. Ma parimenti non è detto che l'azione di queste non possa essere ugualmente pregiudicevole alla definizione dei caratteri organolettici dell'olio.

Quale è dunque la microflora che si trova presente nelle olive colpite da mosca?

L'anno 1948 fu, nelle zone accessibili allo scrivente, assai favorevole a tale ricerca facilitata, d'altronde, per l'interessamento del Prof. VALLEGGI dell'Istituto Tecnico Agrario di Pescia e del Dott. BARTOLONI della sezione entomologica dell'Osservatorio Fitopatologico di Pisa; l'uno e l'altro ebbero la

(1) - R. GIGANTE - *Ricerche sulla morfologia, la biologia e la posizione sistematica del fungo che é stato descritto come " Macrophoma dalmatica "* - Boll. R. Staz. Pat. Veg. di Roma, 1934.

(2) - A. BIRAGHI - *Variazioni in due ceppi di " Gloeosporium olivarum " ALM. di provenienze diverse* - Boll. R. Staz. Pat. Veg. di Roma, 1934.

cortesia di procurarmi campioni di olive di diverse località, altresì raccolte in diversi periodi della stagione e sia in pianta che in terra.

Da questi campioni, con l'usuale tecnica microbiologica, è stato isolato un certo numero di specie alcune delle quali sono state diagnosticate come segue:

1 - *Micrococcus flavus* TREVISAN
(da olive raccolte in terra).
2 - *Bact. candicans* G. et P. FRANKL.
(da olive raccolte in terra).
3 - *Bact.* sp. (*coli* - simile)
(da olive in pianta).
4 - *Bact. fluorescens liquefaciens* FL.
(mai, nelle olive raccolte in pianta; abbastanza frequente nelle olive raccolte da terra).
5 - *Bact. punctatum* L. et N.
(da olive in pianta).
6 - *Bac. mycoides* FL.
(da olive rcccolte in terra).
7 - *Bac. vulgatus*
(da olive raccolte in terra).
8 - *Bac. subtilis* COHN.
(da olive raccolte in pianta e in terra).
9 - *Sarcina flava* DE BARY
(da olive in pianta).
10 - *Rhodotorula mucilaginosa*
(da olive in pianta).
11 - *Candida olea* VAN RIJ et VERONA
(da olive in pianta. Questa specie riveste particolare interesse perchè fu già isolata, dallo scrivente, da sanse di oliva).
12 - *Geotrichum candidum* LINK
(da olive in pianta).
13 - *Acremoniella atra* (CDA) SACC.
(da olive in pianta).
14 - *Aspergillus glaucus* (L.) LINK.
(da olive in pianta).
15 - *Aspergillus niger* v. TIEGH.
(da olive raccolte in terra).

16 - *Cephalosporium* sp.
(da olive raccolte su pianta. Probabile stato microconidico di *Fusarium* sp.).
17 - *Cladosporium herbarum*
(da olive raccolte in terra).
18 - *Fusarium herbarum* v. *avenaceum* (Fr.) Wr.
(da olive raccolte in terra).
19 - *Fusarium* sp. (202 di collezione)
(da olive raccolte in pianta).
20 - *Penicillium chrisogenum* Thom.
(da olive raccolte in pianta).
21 - *Penicillium* sp.
(da olive raccolte in pianta).
22 - *Pestalozzia* sp. *(funerea ?)*
(da olive raccolte in terra).
23 - *Rhizopus nigricans* Ehr.
(da olive raccolte in pianta).
24 - *Trichothecium roseum* Link.
(da olive raccolte in terra).

Nessun dubbio circa la prevalenza numerica e qualitativa delle muffe rispetto ai lieviti e agli schizomiceti.

D'altronde, questa constatazione si rese bene evidente osservando i rispettivi campioni dopo qualche tempo dalla loro raccolta; ed ovviamente assai più facili all'infungamento si dimostrarono le olive raccolte in terra che quelle raccolte in pianta.

Ma l'aspetto più interessante della ricerca era vedere se, almeno qualcuna delle specie isolate, mostrava attività lipolitica.

III - *Metodi di determinazione dell'attività lipolitica dei microbi.*

Giova, a tal punto, far cenno dei principali metodi di determinazione dell'attività lipolitica dei microbi. In realtà tali metodi sono numerosi e ciò, anzi, lascia sottintendere come la ricerca sia, se non ardua, non sempre soddisfacente; mentre, questa stessa molteplicità, lascia anche perplesso il ricercatore nello sciegliere quello, dei metodi, che più si addice al suo scopo.

Qui, il riferimento, è limitato alla indicazione dei metodi più noti oppure a quelli ultimi proposti, non senza avvertire come la maggior parte di essi si

basi sopra l'apprezzamento colorimetrico o titrimetrico dell'acidità che si forma per attività microbica in mezzo contenente gliceridi. Si valuta cioè, nell'acido che si libera, uno dei prodotti dell'avvenuta lipolisi.

Un metodo che può avere applicazione generale, ma che è particolarmente indicato per i funghi è il *metodo di* EYRE (1). Con esso si svela la presenza di enzimi lipolitici nei mezzi colturali ove si sono sviluppati i funghi (enzimi estracellulari) come la presenza degli stessi enzimi nel corpo microbico. Si coltiva il fungo in esame in adatto liquido colturale. Raggiunto un sufficiente sviluppo, il corpo micelico si separa dal liquido. Per vedere se nel liquido sono presenti lipasi si preparano matracci contenenti in parti uguali lo stesso liquido ed un'emulsione all' 1 % in acqua distillata di monobutirrina. In tutti si aggiunge qualche goccia di toluolo per impedire lo sviluppo di germi inquinanti. Dei matracci così preparati una parte viene tenuta a b. m. a 98° C. per 30′ e quindi tutti i matracci vengono posti in termostato a 25 - 30° C. Preventivamente era stata titolata l'acidità neutralizzando con Na OH N/10. Ripetendo la titolazione dopo tre giorni, l'aumento di acidità nei matracci non riscaldati a b. m. dà indice della decomposizione enzimatica della monobutirrina.

Per mettere in evidenza la lipasi contenuta nell'interno del micelio, questo, separato a parte, si fa disseccare in termostato e si tritura in mortaio con uguale quantità in peso di sabbia silicea finissima fino ad ottenere una polvere omogenea. Si preparano allora matracci contenenti la polvere di fungo e una emulsione di monobutirrina all' 1 % in ragione di gr. 0,1 di polvere per ogni 10 cc. di emulsione di monobutirrina. Si aggiungono alcune goccie di toluolo e si pone in termostato a 25-30° C. per cinque giorni dopo avere tenuto a b. m. a 98° C. per 30′ alcuni matracci di controllo. Come per la precedente prova si determina l'acidità prima e dopo l'esperienza titolando con soda N 10.

Tale metodo, in fondo assai semplice, noi si è visto che si può estendere anche alla ricerca dell'attività lipolitica dei batteri e dei lieviti. V'è solo una maggiore difficoltà nella separazione del corpo microbico dai liquidi di coltura. Ma tale difficoltà si supera agevolmente centrifugando e filtrando per candela il liquido. Da una parte abbiamo quindi il liquido amicrobico, dall'altra la massa microbica quale è rimasta nei tubi di centrifuga.

(1) - J. C. EYRE - *Cultural studies on the Aspergilli, with special reference to lipase production of strains isolated from stored copra and cacao* - Ann. of. Appl. Biolog., **19**, *351*, 1932.

Più antico è il *metodo di* EYKMANN, utilizzato peraltro recentemente da DIDDENS e LODDER (1).

Ecco come si opera secondo questi ultimi Autori. Si fonde sego di bue, si filtra, si sterilizza. 1/2 cc. di questo grasso si versa in una scatola Petri sterile e calda in modo che vada a formare un sottile strato. La scatola si lascia due ore in ghiacciaia, quindi si versa agar-Gorodkowa contenente lo 0,1 % di $CaCO_3$, si semina per striscio con la specie microbica in esame e si coltiva in termostato. Se la specie forma enzimi lipolitici e si ha idrolisi del grasso, in corrispondenza dello striscio si forma una zona bianco-creta dovuta alla formazione di sali di calcio degli acidi grassi.

È facile scorgere come questi metodi abbiano un valore puramente qualitativo. Essi non danno indice, cioè, di come marci, ad es., la lipolisi in un mezzo ove abbia sede attività microbica, giacchè l'acido che si libera, e la cui presenza viene presa a base dell'avvenuta lipolisi, può essere riutilizzato.

Più numerosi metodi sono stati ideati allo scopo di ricercare e studiare la flora lipolitica del burro.

Tali metodi, nella maggior parte, si basano sull' impiego di sostanze coloranti, e in particolare del bleu Nilo, come capaci di svelare la liberazione di acidi grassi.

Il solfato di bleu-Nilo fu introdotto nella ricerca da TURNER (2) per presentare esso la particolarità di colorare gli acidi grassi in azzurro e i grassi in rosso; dimostra, peraltro, una certa tossicità.

Ecco come si prepara l'*agar al Nil-bleu solfato di* TURNER:

A) a cc. 100 di agar-brodo si aggiungono cc. 10 di una soluzione allo 0,1 % di solfato di Nil bleu; si distribuisce in provette e si sterilizza;

B) in cc. 100 di agar-acqua allo 0,5 % si emulsionano cc. 10 di grassi e si sterilizza.

Al momento dell'uso si mescola A con B in ragione di 20 su 1, riscaldando allo scopo di far assumere al grasso una colorazione rossastra. Su questo

(1) - EYKMANN - *Centr. f. Bakteriologie*, 1901; in DIDDENS e LODDER: *Die Anaskosporogen* Hefen (II). Amsterdam, 1940.
(2) - TURNER - Proc. Soc. Expt. Biol. Med., **25**, *318*, 1927 - 28.

mezzo si coltivano i microrganismi che, se dotati di attività lipolitica, danno vegetazioni colorate od alonate in azzurro.

Al metodo sono seguite modificazioni, in vista sopratutto di attenuare gli effetti della ricordata tossicità del colorante verso il quale sembrano particolarmente sensibili i lieviti.

Così, STARK e SCHEIB (1) non aggiungono il colorante direttamente all'agar, ma colorano con esso, preventivamente, la materia grassa. Le dosi di colorante risultano in conseguenza ridotte (1 parte di bleu Nilo al 5 % per 9 p. di materia grassa e lavaggi abbondanti con acqua calda per liberare l'eccesso di colore); ma forse la diluizione risulta così forte che il viraggio di colore non sempre può essere bene avvertito.

DEMETER (2) impiega un mezzo base assai ricco in peptone e proteine degradate (acqua di lievito digerita per B. coli) e come sostanza grassa, da emulsionarsi in questo mezzo, del grasso butirrico. Il colorante (bleu Nilo) è aggiunto alla materia grassa e questa neutralizzata in ragione di cc. 1 all' 1 % per 60 di grasso e 20 di acqua calda.

LONG e HAMMER (3) si servono del colorante dopo che la coltura si sia sviluppata, impiegando per questa, naturalmente, un mezzo nutritivo contenente grasso. Sulla coltura versano, e vi lasciano per 30', una soluzione satura di bleu-Nilo. Quindi lavano con acqua: la materia grassa non decomposta è colorata in rosa, quella idrolizzata, in bleu.

HENNEBERG (4) consiglia invece l'uso dell'agar-acqua con aggiunta di bleu di China. Questo metodo è stato utilizzato da DEMETER e MAIER (5) nel modo seguente: si fonde l'agar acqua e si addiziona di una piccola quantità di burro sterilizzato e qualche goccia di una soluzione salura e sterile di bleu di China fino ad ottenere una colorazione bleu-chiara del mezzo. In esso, i germi lipolitici formano, per liberazione di acidi grassi, zone di bleu intenso.

---

(1) - STARK e SCHEIB - *A study of fat splitteing and casein digestin bacteria isolated from butter* - Journ. of Dairy Sc., **19**, *191*, 1936.

(2) - DEMETER - *Die Technik des Mikrobiologischen fettspal ternachweises nebst Angabe eines neuen Verfahrens* - Dtsch. Molkereiztg., **59**, *1802*, 1938.

(3) - LONG e HAMMER - *Methods for the detection of lipolysis by microrganisms* - Jowa St. College J. Sci. **11**, *343*, 1937.

(4) - HENNEBERG - *Die Wichtigkeit der Chinablau Agar Petrischalen für eie bakteriologischen in Milchwirtschaftlichen Laboratorien* - Molkereizeitg, **44**, *363*, 930.

(5) - DEMETER e MAIER - *Ueber Mikroblologische Beschaffenheit u. Qualitatsbefund von Sanerrahmbutter* - Milchwirtsch. Forsch, **11**, *418*, 1931.

PIRAUX (1) ha ripreso in esame, in epoca recentissima, tutto il problema, almeno per quanto ha riferimento alla ricognizione dei germi lipolitici presenti nel burro. Egli si è preoccupato di due cose: di eliminare, cioè, il bleu-Nilo, in quanto tossico e di sostituire ai grassi usualmente impiegati, quali la mono- e la tributirrina, il grasso integrale e naturale.

Parte quindi della crema che prepara come segue: latte fresco è riscaldato a 37-40° C. e scremato fino ad avere crema con il 40 % circa di materia grassa. Tale crema viene diluita in un volume quintuplo di acqua a 40° e di nuovo separata. L'operazione si ripete per tre volte consecutive. A seguito di ciò il tenore in lattosio della crema si abbassa fino a circa 30 mg/litro. Si neutralizza, allora, a pH 7,2 e distribuita in matracci o in tubi si sterilizza a 115° per 20'. Al momento dell'impiego la crema così preparata si aggiunge, in ragione di cc. 0,3 in tubi contenenti quanto segue, a parte preparato e sterilizzato e mescolato al momento:

| | |
|---|---|
| *a)* agar (13 gr. per litro di acqua d.) | cc. 7,5 |
| *b)* 7 parti di soluzione M/15 di fosfato bisodico (11,876 gr. (litro) e 3 p. di sol. m/15 di fosfato monopotassico (9,078 gr./litro) | cc. 0,1 |
| *c)* sol. acquosa di rosso-fenolo 0,72 gr./litro | cc. 0,2 |
| *d)* caseinato di calcio: soluzione a 1,4 % | cc. 0,5 |

In questo mezzo i microbi lipolitici, in quanto liberano acidi grassi, che messi in libertà si disciolgono nella fase liquida del substrato modificandone la reazione che fa virare il colorante, danno colonie alonate di giallo. Il colorante, in realtà, vira per presenza di qualsiasi altra sostanza acida; ma nel mezzo nessun acido si può produrre che non provenga dall'idrolisi del grasso.

Finalmente, in epoca recente, è stato suggerito da BAYLISS, GLICK e SIEM (2) un altro procedimento che poi altro non è che una applicazione del metodo istologico di GOMORI (3). Il principio su cui si basa il metodo è il

---

(1) - E. PIRAUX - *Un milieu de colture particulièrment approprié à la recherche des lipolytiques dans la flore des beurres et à l'ëtude générale de cette flore* - Bull. Inst. Agron. de Stat. de Rech. de Gembloux, 1948.

(2) - M. BAYLISS, D. GLICK e R. A. SIEM - *Demonstration of phosphatases and lipase in bacteria and true fungi by staining methods, ecc.* - Journ. of Bact.. **55**, *307*, 1948.

(3) - G. GOMORI - *The study of enzimes in tissue sections* - Am. J. Clin. Path., **16**, *347*, 1946.
— — *Distribution of lipase in the tissues under normal and under pathologic conditions* - Arch. Path., **41**, *121*, 1946.

seguente: trasformare in solfuri i sali di calcio degli acidi grassi che questi formano allorquando si liberano in seguito alla attività della lipasi. La reazione si rende evidente per il colore nero del solfuro.

Occorrono i seguenti reagenti:

1. - Soluzione acida di citrato sodico: si prepara mescolando 2 Volumi di HCl $\frac{0,1}{M}$ in 8 volumi di citrato sodico ottenuto sciogliendo 20 gr. di acido citrico in 200 cc. di una soluzione normale di idrato sodico.
2. - Substrato:
   sol. A) - cc. 150 di glicerina al 30 %, 50 cc. di cloruro di calcio al 10 %, 50 cc. di una soluzione acida di barbiturato di sodio ottenuto mescolando 29 cc. di barbiturato di sodio 0,1/M in cc. 21 di HCl 0,1/M. Il tutto portato ad un litro con acqua distillata.
   sol. B) - sospensione di grasso al 5 % in acqua. (Il substrato si prepara aggiungendo 2 cc. di A) a 50 cc. di B).
3. - Sol. di solfuro ammonico.
4. - Nitrato di piombo: soluzione al 2 %.

Si opera per tempi successivi:

I - Si distende su vetrino la vegetazione microbica lasciandola essiccare.
II - Si fissa in acetone per 10′.
III - Lavaggio in acqua distillata.
IV - Immersione nella soluzione acida di citrato sodico per 30′.
V - Ulteriore lavaggio in acqua distillata.
VI - Si distende quindi sul vetrino il substrato cui in 2.
VII - Lavaggio sempre in acqua distillata.
VIII - Immersione per 10′ nella sol. di nitrato di piombo.
IX - Lavaggio in acqua distillata.
X - Immersione per 1-2′ in solfuro ammonico.
XI - Lavaggio.

Se presenti lipasi le cellule si colorano in nero per la formazione di solfuro di piombo.

IV. - *Qualche saggio sulla attività lipolitica delle specie isolate.*

Un primo orientamento fu tratto coltivando le specie isolate in agar di TURNER al nil-bleu solfato. I risultati raccolti dettero un' idea relativamente

vaga perchè non tutte le specie cimentate si sviluppano ugualmente bene mentre, ripetuta la prova, non sempre si ebbe conferma dei resultati conseguiti.

Successivamente fu utilizzato il metodo di EYRE precedentemente descritto, peraltro saggiando la lipolisi oltre che su monobutirrina (come prescrive il metodo) anche su trioleina e olio di oliva disacidificato.

I risultati ottenuti figurano nella annesse Tabelle.

TAB. I - Presenza di enzimi lipolitici estracellulari in alcuni microrganismi isolati da olive attaccate da *Dacus*. (Secondo il metodo di EYRE (v. testo) avendo coltivato i funghi in liquido di CZAPECK, i lieviti in malto, i batteri in brodo nutritivo).

| | cc. di Na OH N/10 occorsi a neutralizzare cc. 100 di liquido colturale filtrato per candela e addizionato di | | |
|---|---|---|---|
| | olio neutro 1 % | trioleina 1 % | monobutirrina 1 % |
| | (dopo 5 giorni a 25° C.) | | |
| ceppo n.° 3 (coli simile) | 0.8 | 1.— | 5.2 |
| Microc. flavus | — | — | — |
| Bact. punctatum | — | — | — |
| Bac. vulgatus | 1.6 | 3.— | 10.1 |
| Bac. mycoides | — | — | 3.— |
| Bac. subtilis | 0.5 | 1.5 | 9.2 |
| Sarcina flava | — | — | — |
| Rhodotorula mucilaginosa | — | — | — |
| Acremoniella atra | — | 1.7 | 4.3 |
| Cladosporium herbarum | — | — | — |
| Fus. herb. avenaceum | — | 0.8 | 3.6 |
| Pen. chrisogenum | — | — | — |
| Trichothecium roseum | 0.3 | 0.8 | 4.— |
| Cephalosporium sp. | 0.2 | 0.7 | 2.— |

TAB. II - Presenza di enzimi lipolitici intracellulari in alcuni microrganismi isolati da olive attaccate da *Dacus*. (Secondo il metodo di EYRE (v. testo) avendo raccolto la massa microbica su liq. di CZAPEK (funghi), malto (lieviti) o brodo nutritivo (batteri).

| | cc. di Na OH N/10 occorsi a neutralizzare cc. 10 di emulsione 1 % di grasso presente corpo microbico in ragione di gr. 0,1 | | |
|---|---|---|---|
| | olio neutro | trioleina | monobutirrina |
| | (dopo 5 giorni a 25° C.) | | |
| ceppo n.° 3 (coli-simile) | — | 0.4 | 1.2 |
| Microc. flavus | — | — | — |
| Bact. punctatum | — | — | — |
| Bact. vulgatus | 0.3 | 0.9 | 1.6 |
| Bac. mycoides | — | — | 0.7 |
| Bac. subtllis | 0.4 | 0.4 | 0.9 |
| Sarcina flava | — | — | — |
| Rhodotorula mucilaginosa | — | — | — |
| Acremoniella atra | 1.2 | 5.4 | 1.7 |
| Cladosporium herbarum | — | — | — |
| Fus. herb. avenaceum | 0.8 | 4.— | 0.8 |
| Pen. chrisogenum | 1.— | 5.2 | 1.2 |
| Trichothecium roseum | 0.5 | 1.9 | 0.6 |
| Cephalosporium sp. | 1.2 | 3.7 | 1.— |

Risulta che molte, delle specie studiate, sono capaci di elaborare enzimi lipolitici intra ed estracellulari.

Può apparire interessante notare che mentre, per gli enzimi estracellulari, meglio di ogni altro grasso risulta essere attaccata la monobutirrina, per gli enzimi intracellulari risulta forse meglio attaccata la trioleina.

Un' ultima ricerca è stata eseguita con *Candida olea*. A parte sviluppata su malto, dopo avere eliminato la quasi totalità del liquido, lasciando al fondo la massa cellulale, fu versato nel recipiente di coltura olio di oliva del commercio: quindi fu determinata, all' inizio e periodicamente, l' acidità presente

nell'olio aggiunto alla coltura in rapporto a quella dello stesso olio lasciato a parte come controllo.

Fu notato quanto segue:

| | acidità % (in ac. oleico) | |
|---|---|---|
| | nell'olio di controllo | nell'olio versato nella coltura |
| iniziale | 0.76 | 0.76 |
| dopo giorni 2 | 0.76 | 1.75 |
| » » 6 | 0.76 | 2.— |
| » » 12 | 0.75 | 2.53 |
| » » 20 | 0.77 | 2.58 |

Anche *Candida olea* si dimostra dunque lipolitica, come in precedenza, d'altronde, era stato accertato. Il suo attacco, anzi, nelle condizioni realizzate dall'esperimento, si dimostra singolarmente pronto.

* * *

Riassumendo: nelle olive colpite da *Dacus oleae* si sviluppano germi (batteri, lieviti, funghi) che, almeno in parte, si dimostrano lipolitici. Ciò spiega come l'olio ottenuto dalla spremitura di queste olive presenti una forte acidità libera. D'altronde, lo stesso sviluppo microbico, indipendentemente da ogni attività lipolitica, si pensa che possa essere causa di alterazione del prodotto per il possibile passaggio, nell'olio, di composti dovuti al metabolismo microbico.

**Istituto di Patologia Vegetale**
**e Microbiologia Agraria e Tecnica**
**Università di Pisa**

*(Presentata il 26 Febbraio 1950).*